

COPY

①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ Offenlegungsschrift  
⑩ DE 43 42 728 A 1

⑤1 Int. Cl.<sup>6</sup>:  
A01 N 1/02  
B 01 F 17/14  
A 61 H 1/00

⑲ Aktenzeichen: P 43 42 728.6  
⑳ Anmeldetag: 15. 12. 93  
㉑ Offenlegungstag: 22. 6. 95

⑦1 Anmelder:  
Dr. Karl Thomae GmbH, 88400 Biberach, DE

⑦2 Erfinder:  
Grünert, Adolf, Prof. Dipl.-Chem. Dr. Dr., 89075 Ulm, DE;  
Qiu, Huade, Prof. Dr., 89075 Ulm, DE; Müller, Irene, 89075 Ulm, DE; Schuh, Stefan, 89075 Ulm, DE;  
Steinbach, Gerald, Dr., 89233 Neu-Ulm, DE;  
Wennauer, Roman, Dipl.-Biol. Dr., 89134 Blaustein, DE;  
Wolf, Christian-Friedrich, Dr., 89075 Ulm, DE

⑤4 Verfahren, Apparate und Perfusionslösungen zur Konservierung explantierter Organe

⑤7 Die Erfindung betrifft die Konservierung explantierter Organe, insbesondere der explantierten humanen Leber, und insbesondere Verfahren, Apparate und Perfusionslösungen zur Konservierung dieser Organe, wobei die Perfusionslösungen eine wässrige Fettemulsion sowie für die Sauerstoffversorgung eine Perfluorcarbonemulsion enthalten.

43 42 728 A 1

DE 43 42 728 A 1

BEST AVAILABLE COPY

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft die Konservierung explantierter Organe, insbesondere der explantierten humanen Leber, und insbesondere Verfahren, Apparate und Perfusionslösungen zur Konservierung dieser Organe.

Die erste Lebertransplantation beim Menschen wurde 1963 von Dr. Thomas Starzl durchgeführt (Starzl et al., Surg. Gynecol. Obstet., 17: 659—676, 1963).

Danach nahm durch die Zunahme der technischen und medizinischen Behandlungsmöglichkeiten die Lebertransplantationsmedizin an Umfang weltweit gesehen sprunghaft zu. Einen limitierenden Engpaß stellt die Verfügbarkeit von vitalen transplantablen Organen dar, die noch erhebliche Defizite aufweist.

Eine der wichtigsten Voraussetzungen für den Erfolg der Lebertransplantation ist, wie bei allen Transplantationen, die extrakorporale schädigungsfreie Konservierung der Spenderleber.

Bis 1989 wurden Spenderlebern in der Zeit zwischen Explantation und Transplantation in Lösungen konserviert, die eine hohe Osmolalität und eine hohe Konzentration von Kalium enthielten. Eine typische Zusammensetzung stellt die im folgenden charakterisierte Euro-Collins-Lösung dar (siehe Starzl et al., Current Problems in Surgery, Liver Transplantation: A 31 — Year Perspective, Part 1, Year Book Medical Publishers, Inc., 1990, S. 69):

Bicarbonat 10 mM/l; Chlorid 15 mM/l;  
Phosphat 57,5 mM/l; Natrium 10 mM/l;  
Kalium 115 mM/l; Glucose 194 g/l;  
Osmolalität 375 mOsm/l und pH 7,4.

Unter Verwendung dieser Lösung muß die Leber nach der Explantation unter Kühlung, z. B. bei 4°C, konserviert werden. Die Sicherheitsgrenze für die Aufbewahrungszeit beträgt ca. 8 Stunden.

Bei diesem Konservierungssystem treten zwei Probleme hervor: Erstens verursacht die Hypothermie eine Zellschwellung, die als Folge die Entblößung der Sinusoidalzellauskleidung hat. Zweitens ist die Aufbewahrungszeit mit nur 8 Stunden sehr kurz.

Die bekannte von Belzer (University of Wisconsin) entwickelte Perfusionslösung ist eine verbesserte Lösung, die in einigen Fällen eine Aufbewahrungszeit bis zu 24 Stunden erlaubt.

Die Lösung der University of Wisconsin hat folgende Zusammensetzung (siehe Starzl et al., Current Problems in Surgery, Liver Transplantation: A 31 — Year Perspective, Part 1, Year Book Medical Publishers, Inc., 1990, S. 69):

Phosphat 25 mM/l; Lactobionat 100 mM/l;  
Natrium 30 mM/l; Kalium 120 mM/l;  
Magnesium 5 mM/l; Hydroxyethylstärke 50 g/l;  
Raffinose 17,8 g/l; Adenosin 1,34 g/l;  
Glutathion 0,922 g/l; Insulin 100 Einheiten;  
Allopurinol 0,136 g/l; Sulphamethoxazol 40 mg/l;  
Trimethoprim 8 mg/l; Dexamethason 8 mg/l;  
und Osmolalität von 320 mOsm/l und pH von 7,4.

Obwohl es in experimentellen Studien bei einzelnen klinischen Anwendungen schon gelungen ist, mit dieser Lösung eine isolierte Leber bis zu 48 Stunden hypotherm zwischen 0°C und 4°C aufzubewahren und danach mit Erfolg orthotop zu transplantieren, werden jedoch bei systematischem Einsatz dieses Systems zunehmend

Berichte über sogenannte Kälteschäden bekannt, die für das primäre posttransplantative Leberversagen verantwortlich zu sein scheinen. Zur Vermeidung dieser Schädigungen wurde in einigen Forschungsprojekten der Versuch unternommen, die isolierte Leber unter höherer Temperatur bei 7°C, bei 15°C und bei 37°C zu konservieren. Aus diesen Untersuchungen sind aber bis jetzt weder in den Diskussionen mit den bekannten Forschungsgruppen noch in der Literatur praktikable Verfahren entwickelt worden (Starzl et al., Current Problems in Surgery, Liver Transplantation: A 31 — Year Perspective, Part 1, Year Book Medical Publishers, Inc., 1990, S. 49—116).

Die begrenzte Aufbewahrungszeit und die oben diskutierte Schädigung bei hypothermer Konservierung führt zu Defiziten der Verfügbarkeit der vitalen Organe.

Aufgabe der Erfindung ist, ein Spenderorgan langfristiger als vorher und/oder bei höherer Temperatur, z. B. Raumtemperatur, für einen ausreichenden Zeitraum aufzubewahren.

Ein Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung einer wäßrigen Fettemulsion zur Herstellung einer wäßrigen, elektrolythaltigen Perfusionslösung zur Konservierung einer operativ entfernten Leber (Spenderleber) in vitalem Zustand.

Die Perfusionslösung enthält als Sauerstoffträger zusätzlich eine Perfluorcarbon-Emulsion (PFC-Emulsion).

In der Praxis der Konservierung einer Spenderleber gemäß der Erfindung wird die Vitalitätserhaltung durch die suffiziente Zufuhr von Sauerstoff über die PFC-Emulsion und durch die Bereitstellung der Fettemulsion, die bei ausreichender Oxygenierung ein physiologisches Substrat für die Leber darstellt, erreicht.

Zweckmäßigerweise wird während der Perfusion des explantierten Organs Sauerstoff über eine geeignete Leitung und ein Filter in Form von Gasbläschen in die Perfusionslösung eingeleitet. Die Durchflußrate der Sauerstoff-Einleitung beträgt beispielsweise 0,1 bis 1 l/min, bevorzugt 0,3 bis 0,7 l/min. Besonders bevorzugt ist eine Durchflußrate von 0,5 l/min.

Die eingesetzten Fettemulsionen können aus konventionellen auf dem Markt befindlichen Komponenten zusammengesetzt sein. Bevorzugt werden sie aus der klinischen Infusionstherapie übernommen. Man setzt dabei stabile Fettemulsionen auf der Basis von Sojabohnenölen emulgiert mit Ei-Lecithinen in wäßrigen elektrolythaltigen isotonen Lösungen ein, wie z. B. Abbolipid® 10%/—20% (Abbott), Intralipid® 10%/Intralipid 20% (Pfrimmer Kabi), Lipofundin® MCT 10%/—20% (Braun Melsungen), Lipofundin (R) 10%/20% (Braun Melsungen), Lipoharm® 10%, 20% (Schiwa/Hormonchemie), Lipovenös (R) 10%, 20% (Fresenius), siehe Rote Liste, BPI e.V., 1992.

Die Fettemulsion kann auch nach bekannter Methode hergestellt werden, wie z. B. in Clinical Nutrition 11, 223—236 (1992) beschrieben worden ist.

Die Fettpartikel der Fettemulsion besitzen beispielsweise eine mittlere Partikelgröße von 200 bis 2000 nm, vorzugsweise von 600 bis 1000 nm.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine wäßrige elektrolythaltige isotone Lösung zur Perfusion und Konservierung explantierter Organe, insbesondere einer operativ entfernten Leber, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Fettemulsion und als Sauerstoffträger eine Perfluorcarbonemulsion enthält. Die Perfusionslösung enthält 0,5 bis 3% (v) einer 20%igen (w/v) Fettemulsion pro Liter der Perfusionslösung oder eine äquivalente Menge einer Fettemulsion mit anderer Konzentration,

so daß ein Fettgehalt der Perfusionslösung von 0,1 bis 0,6% (w/v) resultiert. Vorzugsweise beträgt der Fettgehalt der Perfusionslösung 0,2 bis 0,5% (w/v), besonders bevorzugt ist ein Fettgehalt von 0,4% (w/v). Der Perfluorcarbongehalt der Perfusionslösung beträgt 10 bis 30% (w/v), vorzugsweise 20% (w/v). Die prozentualen Angaben beziehen sich auf das Volumen (v) bzw. das Gewicht/Volumen (w/v).

In der Literatur werden mehrere Perfluorcarbon-Substanzen als Sauerstoffträger beschrieben, die in dieser Erfindung Verwendung finden können, siehe z. B. EP-A 0282 948, EP-A 0231 070, EP-A 091 820, EP-A 0190 393, EP-A 220 152 und Französisches Patent No. 850992.

Bevorzugt werden Perfluorooctylbromid (PFOB) oder eine Mischung aus Perfluordecalin (PFD) und Perfluortripropylamin (PFT). Ein kommerzielles Präparat der Mischung aus PFD und PFT ist als Fluosol DA der Firma Green Cross Corporation bekannt.

Eine Perfluorcarbonemulsion ist, wie oben beschrieben, schon bekannt und käuflich. Die PFC-Emulsion kann auch nach bekannten Methoden, wie in den oben erwähnten Patent-Publikationen, hergestellt werden.

Um nach der üblichen Methode eine PFC-Emulsion herzustellen wird ein Emulgator (z. B. Serval, Pluronic oder Synperonic) mit frischer Elektrolyt-Lösung versetzt und kräftig gerührt. Ein Teil der resultierenden Mischung wird danach in einen Hochdruckhomogenisator gegeben und die Homogenisierung unter langsamer Zugabe des restlichen Teils der Mischung und des PFC in Gang gesetzt. Die resultierende Emulsion wird danach bis z. B. 5°C gekühlt und erneut homogenisiert.

Normalerweise hat die PFC-Emulsion, die in dieser Erfindung verwendet wird, eine mittlere Partikelgröße von 100 bis 400 nm, vorzugsweise 150 bis 250 nm. Besonders bevorzugt ist eine mittlere Partikelgröße von 180 bis 240 nm.

Als Elektrolyt-Lösung, die die kontinuierliche Phase der Perfusionslösung darstellt, können z. B. alle bisher in der Leberkonservierung benutzten Lösungen verwendet werden (siehe z. B. Starzl et al., Current Problems in Surgery, Liver Transplantation: A 31 — Year Perspective, Part 1, Year Book Medical Publishers, Inc., 1990, S. 49—116). In Frage kommen vorzugsweise die Lösungen von Bretschneider (siehe unten), die Lösung von EuroCollins und die Lösung der University of Wisconsin.

Vorzugsweise ist die kontinuierliche Phase der Perfusionslösung eine wäßrige elektrolythaltige isotonische Lösung, die 3,5 bis 100 mMol/l Kaliumionen, 0,8 bis 5 mMol/l Magnesiumionen und 15 bis 146 mMol/l Natriumionen enthält.

Die Osmolalität der Perfusionslösung beträgt vorzugsweise 350 bis 400 mOsmol/kg.

Das Verfahren zur Konservierung einer operativ entfernten Leber gemäß der Erfindung ist dadurch gekennzeichnet, daß die Leber in einer wäßrigen elektrolythaltigen isotonischen Lösung, die eine Fettemulsion und eine Perfluorcarbonemulsion enthält, aufbewahrt und mit einer solchen Lösung perfundiert wird.

Vorzugsweise wird die Leber mit der Lösung durch die Vena portae perfundiert.

Das Verfahren kann ohne Kühlung (Hypothermia) bei Temperaturen zwischen 15 und 30°C, vorzugsweise bei einer Raumtemperatur von 19 bis 22°C, durchgeführt werden. Bei dieser Temperatur, die erheblich höher ist als bei der herkömmlichen Methode, wird das Auftreten der vorstehend erwähnten Kälteschäden vermieden.

Ein wichtiger Vorteil des Verfahrens gemäß der Erfindung ist die gegenüber herkömmlichen Verfahren verlängerte Konservierungsdauer von bis zu 48 Stunden. Bevorzugt ist eine Konservierungsdauer von bis zu 24 Stunden bei Raumtemperatur.

Ein Apparat gemäß der Erfindung zur Konservierung eines explantierten Organs ist dadurch gekennzeichnet, daß er aus einem Behälter für eine Perfusionslösung besteht, in dem das Organ umgeben von Lösung erhalten werden kann, mit einer Zuleitung und einer Pumpe versehen ist, die zur Zirkulierung einer Perfusionslösung zwischen dem Behälter und dem Organ adaptiert sind, sowie Mittel zur Aufrechterhaltung der Sauerstoffkonzentration der im Apparat enthaltenen Perfusionslösung besitzt.

Bei dem erfindungsgemäßen Apparat befindet sich vorzugsweise mindestens ein Teil der Zuleitung und die Pumpe zur Zirkulierung der Perfusionslösung außerhalb des Behälters.

Ist das Organ eine Leber, wird zur Zirkulierung der Perfusionslösung zwischen dem Behälter und der V. portae sowie der V. cava eine Zuleitung adaptiert.

Vorzugsweise enthält der Apparat Mittel zur Halterung oder Suspendierung des Organs, wobei die gesamte Oberfläche des Organs Kontakt mit der Perfusionslösung hat. Zusätzlich kann der Apparat mit einer Vorrichtung versehen sein, mit deren Hilfe die Temperatur der Perfusionslösung und somit des perfundierten Organs reguliert werden kann. Vorzugsweise kann mit Hilfe dieser Vorrichtung eine Temperatur zwischen 15 und 30°C der Perfusionslösung und somit des in der Perfusionslösung liegenden Organs aufrechterhalten werden. Besonders bevorzugt wird die Perfusion bei Raumtemperatur durchgeführt, so daß die Perfusionslösung sowie das perfundierte Organ eine Temperatur von 19 bis 22°C aufweisen.

Die Harnstoffsynthese ist ein leberspezifischer Prozeß und kann daher zur Überprüfung der Vitalität des Organs herangezogen werden.

Die vorliegende Erfindung bietet eine Methode zum Testen der Vitalität einer explantierten Leber, welche in einer wäßrigen elektrolythaltigen Lösung perfundiert wird. Bei dieser Methode wird der Perfusionslösung mindestens eine von der Leber metabolisierbare Aminosäure während des erfindungsgemäßen Konservierungsverfahrens zugesetzt. Nach einem bestimmten Zeitabstand nach der Applikation wird die Konzentration des Ammoniaks und des Harnstoffs in der Perfusionslösung bestimmt.

Vorzugsweise wird eine Mischung von Aminosäuren zugesetzt, z. B. können 10 bis 100 ml, vorzugsweise 40 bis 60 ml einer 10 bis 20%igen Aminosäurelösung verwendet werden.

Die Aminosäure wird von Zeit zu Zeit während der extrakorporalen Konservierung der Leber der Perfusionslösung, z. B. bei Zusatz der Lösung in den Behälter oder vorzugsweise in der Zuleitung, zugefügt.

Die bevorzugten Grenzen der applizierten Aminosäuremengen liegen zwischen 5 g und 10 g pro Test. Dabei wird bevorzugt ein aus der Infusionstherapie stammendes Gemisch von Aminosäuren angewendet (z. B. eine der Infusionslösungen, die unter der Bezeichnung Thomaeamin im Handel ist (s. Rote Liste, ibid)). Die Applikation von Einzelaminosäuren ist im Prinzip möglich, wird aber nicht bevorzugt, da Einzelaminosäuren zu Imbalancen führen und die Toxizitäten der Aminosäuren unterschiedlich und meist nicht genau bekannt sind. Bei intakter Harnstoffsynthese kommt es z. B. bei

der Applikation von Aminosäuren, die nach der erfindungsgemäßen Methode mit 50 ml einer 15%igen Aminosäurenlösung durchgeführt wird, zu einem Anstieg der Harnstoffproduktion von z. B. 2,5 mMol in 4 Stunden nach einer Aminosäurenapplikation von 7,5 g. Die Ammoniakkonzentration bleibt bei ausreichender Leberperfusion unter 50  $\mu$ Mol/l. Sie steigt drastisch an, wenn die Energieversorgung der Leber zusammenbricht.

Die leberspezifische Harnstoffsynthese kann also durch diese Applikation von Aminosäuren in das Perfusat und die analytische Überprüfung von Harnstoff und Ammoniak getestet werden. Bei intakter Perfusion kommt es zu einem Anstieg der Harnstoffproduktion von mehr als z. B. 2,5 mMol in 4 Stunden. Bei nicht ausreichender energetischer Versorgung wird kein Harnstoff synthetisiert und es kommt zu einem entsprechenden Anstieg der Ammoniakkonzentration über 100  $\mu$ Mol/l.

Die Applikation von Fettemulsionen, die der Substratversorgung des Organs dient, wird im Perfusat überprüft durch die analytische Bestimmung des Triglyceridgehaltes und die analytische Überprüfung der "freien Fettsäuren", die zur Prüfung der Verwertung der Fettsäuren dient. Die analytische Bestimmung erfolgt nach literaturbekannten Methoden, beispielsweise durch gaschromatographische Bestimmung der Fettsäuremethylester nach Veresterung der freien Fettsäuren mit Methyljodid über festem Kaliumcarbonat, analog der in Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 13, 407–412 (1975) beschriebenen Arbeitsvorschrift. Wenn die Verwertung nicht stattfindet, kommt es zu einem Anstieg der freien Fettsäuren, da im Perfusat durch die lebergefäßwandständige Lipase eine Lipolyse stattfindet. In den oben beschriebenen Perfusionsversuchen kam es nicht zum Anstieg der freien Fettsäuren und damit offensichtlich zur Verwertung der Fettsäuren in der Leber.

Die vorliegende Methode bietet also eine Methode zum Testen der Vitalität eines explantierten Organs, insbesondere einer Leber, das in einer wäßrigen elektrolythaltigen Lösung perfundiert wird, dadurch gekennzeichnet, daß der Lösung eine Fettemulsion zugesetzt und nach einem bestimmten Zeitabstand die Konzentration der freien Fettsäuren bestimmt wird.

#### Beispiel 1

Folgende drei untersuchten Lösungen sind

A. Brettschneider (HTK)-Lösung mit der Zusammensetzung

Natriumchlorid 15 mM/l; Kaliumchlorid 9 mM/l;

Kaliumhydrogen-2-oxoglutarat 1 mM/l;

Magnesiumchlorid  $\times$  6H<sub>2</sub>O 4 mM/l;

Histidin  $\times$  HCl  $\times$  H<sub>2</sub>O 18 mM/l;

Histidin 180 mM/l; Tryptophan 2 mM/l;

Mannit 30 mM/l;

in Aqua ad injectabilia;

Osmolalität: 310 mOsm/kg;

Anion: Cl 50 mval;

H = Histidin, T = Tryptophan, K = Kalium.

B. Brettschneider-Lösung wie in A. mit einer Perfluorcarbon (PFC)-Emulsion

C. Brettschneider-Lösung mit PFC-Emulsion wie in B. mit Fettemulsion

#### Herstellung der Lösungen B und C

Unter kräftigem Rühren werden 8 l frische Brettschneider-Elektrolyt-Lösung portionsweise mit 396 g Emulgator (Serva, Heidelberg) versetzt.

Sobald sich der Emulgator vollständig gelöst hat, wird die Lösung mit Elektrolyt-Lösung auf 8,1 l aufgefüllt und auf 5°C abgekühlt.

Ein Hochdruckhomogenisator (Lab 60 der Firma APV Gaul in) wird mit ca. 600 ml reiner Elektrolyt-Lösung gespült. Anschließend wird ein Teil der Elektrolyt-Lösung in den Vorlagenbehälter des Homogenisators gefüllt.

Nun wird der Ansatz mit 500 bar unter CO<sub>2</sub>-Atmosphäre homogenisiert, wobei der restliche Teil der Elektrolyt-Emulgator-Lösung und 1000 ml Perfluorcarbon über je einen Scheidetrichter so langsam in den Vorlagenbehälter zugegeben werden, daß kurz nach Beendigung der Zugabe von Perfluorcarbon der erste Homogenisierungsdurchlauf beendet ist.

Die Emulsion wird anschließend mit Eiswasser wieder auf 5°C abgekühlt und erneut bei 500 bar unter CO<sub>2</sub>-Atmosphäre homogenisiert. Dieser Vorgang wird 5mal wiederholt.

Die fertige Emulsion enthält Perfluorcarbon 20% w/v und eine mittlere Teilchengröße von 180–240 nm. Sie ist bis zur baldigen Verwendung bei ca. 5°C zu lagern.

Die Lösung C erhält man aus der so hergestellten Lösung B durch Zumischen einer 20%igen (w/v) Fettemulsion, beispielsweise von Intralipid-20, so daß ein Fettgehalt der fertigen Perfusionslösung C von beispielsweise 0,2% (w/v) resultiert. Demgemäß enthält 1 l der Lösung C beispielsweise 20 ml der 20%igen (w/v) Fettemulsion.

#### Beispiel 2

Mehrere 20 kg schwere Hausschweine werden in i.v. Narkose laparotomiert, thorakotomiert und ihre Leber nach üblicher chirurgischer Methode unter intravenöser Zugabe von 125 Einheiten Heparin pro kg Körpergewicht explantiert.

Die Vena portae und die Vena cava inferior werden durchtrennt und kanüliert.

Das in der Leber zurückgebliebene Restblut wird durch die Infusion von 300 ml der Lösung A, B oder C (Beispiel 1) über die kanülierte Vena porta ausgespült. Während dieser Freispülung wird der Ductus choledochus kanüliert.

Die kanülierte Leber [1] wird in den Behälter [1] (vgl. Fig. 1) gegeben, bis sie in der darin enthaltenen Perfusionslösung völlig untergetaucht ist. Als Perfusionslösung wird eine gemäß Beispiel 1 hergestellte Lösung C mit einem Anfangs-Fettgehalt von 0,1% (w/v) verwendet. Der Perfusionskreislauf [2] verbindet V. portae [13] und V. cava [12] über die externe Zuleitung mit dem Außenbehälter, wobei mittels der Pumpe [3], z. B. einer Peristaltikpumpe, die Perfusionslösung kontinuierlich zwischen Leber und dem Behälter zirkuliert.

Sauerstoff wird von einer Sauerstoff-Gasflasche [4] über eine Leitung [5] durch einen Filter (in Fig. 1 nicht dargestellt) am inneren Rand des Behälters [1] als Gasbläschen mit einer Durchflußrate von etwa 0,5 l/min in die Perfusionslösung eingeleitet. Im Behälter befindet sich ein Netz [6] aus Kunststoff oder Metall, um die Leber zu betten, ohne daß ein wesentlicher Teil der Leberoberfläche ohne Kontakt mit der Perfusionslösung bleibt.

Weder Leber noch Apparat noch Perfusionslösung müssen erwärmt oder gekühlt werden.

Durch die Kanülierung [7] der D. choledochus wird die ausfließende Galle im Außenbehälter gesammelt.

Die kontinuierliche Perfusion beginnt 10 Minuten nach Explantation durch die Vena portae.

Die mediane Geschwindigkeit der Perfusionslösung wird auf 0,3 ml/g Lebergewicht/min justiert.

Die Leber verbleibt für die gesamte extrakorporale Konservierungszeit bei einer Raumtemperatur von etwa 22°C in der entsprechend gepufferten Lösung.

[8] bezeichnet eine Entnahmestelle für Proben der Perfusionslösung zu analytischen Zwecken.

In die Zuleitung [2] ist ein Druckmesser [9] und eine Eingabestelle [10] für Fettemulsionen integriert, die beispielsweise aus einer Injektionsspritze, gekoppelt mit einem in der Zuleitung eingebauten Ventil, besteht.

Zur Kompensation des Verbrauchs an Fettemulsion erfolgt jeweils nach Ablauf von 6 Stunden eine Zugabe von 12,5 ml Intralipid-20 direkt in die Perfusionslösung.

In vierstündigen Abständen erfolgen Biopsien zur elektronenmikroskopischen Untersuchung und Perfusantentnahme zur Analyse der Perfusatzusammensetzung (Elektrolyte, pH-Wert, Osmolalität und Gasanalysen).

Die Perfusantentnahmen zur Prüfung der Funktionsfähigkeit der Leber erfolgen in 2stündigen Abständen.

#### Harnstoffsynthese

Ein Harnstoffproduktionstest wird vorgenommen, indem alle 4 Stunden 50 ml 15%ige Aminosäurenlösung (Thomacamin N15, Dr. Karl Thomae GmbH) dem Perfusat zugesetzt werden und in zweistündigen Abständen jeweils eine Probe zur Harnstoff- und Ammoniak-Bestimmung entnommen wird. Die Harnstoff- und Ammoniak-Bestimmungen erfolgen nach literaturbekannten Methoden. Die Harnstoffbestimmung ist beispielsweise beschrieben in R. Spayd et al., Clin. Chem. 24, 1343—1344 (1978), die Ammoniakbestimmung ist beschrieben in W.A. Bruce et al., Clin. Chem. 24, 782—787 (1978).

Fig. 2 zeigt im Vergleich der Lösung A, B und C (siehe Beispiel 1) die Zunahme der Harnstoffkonzentration im Perfusat einer Schweineleber, wobei die Perfusion mit folgenden Abwandlungen wie vorstehend beschrieben durchgeführt wurde:

- Perfusionslösung A, jedoch ohne Sauerstoff-Einleitung
- Perfusionslösung A, mit Sauerstoff-Einleitung
- Perfusionslösung B, mit Sauerstoff-Einleitung
- Perfusionslösung C, mit Sauerstoff-Einleitung.

Fig. 3 zeigt, korrespondierend zu Fig. 2, die Entwicklung der Ammoniakkonzentration in den selben Perfusionslösungen.

Fig. 2(d) belegt eindeutig, daß bei Verwendung der erfindungsgemäßen Perfusionslösung C unter Sauerstoff-Einleitung die Harnstoffkonzentration über einen Perfusionszeitraum von 48 Stunden nahezu stetig und in signifikant stärkerem Maße zunimmt, als dies bei der Perfusion mit den Vergleichslösungen A und B der Fall ist (vgl. Fig. 2(a)–(c)).

Aus Fig. 3(d) geht hervor, daß im Gegensatz zu den Lösungen A und B (Fig. 3(a)–(c)) die Ammoniakkonzentration im Perfusat C während dieses Perfusionszeitraumes vernachlässigbar gering bleibt.

Damit ist die überlegene Erhaltung der Funktionsfähigkeit des Versuchsorgans mit Hilfe der erfindungsgemäßen Perfusionslösung C eindeutig nachgewiesen.

Aus den Gewebeproben werden elektronenmikroskopische Präparate angefertigt, die über ein Computersystem planimetriert werden und somit quantitative Zahlen für die Mitochondrienzahl und die Durchmesser bzw. die Form der Mitochondrien ermöglichen.

#### Patentansprüche

- Eine wäßrige elektrolythaltige isotonische Lösung zur Perfusion und Konservierung einer operativ entfernten Leber, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Fettemulsion und als Sauerstoffträger eine Perfluorcarbonemulsion enthält, wobei der Fettgehalt der Lösung 0,1 bis 0,6% (w/v) und der Perfluorcarbongehalt 10 bis 30% (w/v) beträgt.
- Eine Lösung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Lösung 3,5 bis 100 mMol/l Kaliumionen, 0,8 bis 5 mMol/l Magnesiumionen und 15 bis 146 mMol/l Natriumionen enthält.
- Eine Lösung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Osmolalität der Lösung 350 bis 400 mOsmol/kg beträgt.
- Eine Lösung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Fettpartikel der Fettemulsion aus mit Ei-Lecithin emulgierten Sojabohnenölen bestehen.
- Eine Lösung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Fettpartikel der Fettemulsion eine mittlere Partikelgröße von 200 bis 2000 nm aufweisen.
- Die Verwendung einer wäßrigen Fettemulsion zur Herstellung einer Lösung gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5 zur Perfusion und Konservierung einer operativ entfernten Leber in vitalem Zustand.
- Ein Verfahren zur extrakorporalen Konservierung einer operativ entfernten Leber, dadurch gekennzeichnet, daß die Leber in einer Lösung gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5 aufbewahrt und mit dieser Lösung perfundiert wird.
- Ein Verfahren gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Konservierung bei einer Temperatur zwischen 15 und 30°C durchgeführt wird.
- Ein Verfahren gemäß Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Konservierung bis zu 48 Stunden lang andauert.
- Ein Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 7 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß während der Konservierung Sauerstoff in die Perfusionslösung eingeleitet wird.
- Ein Apparat zur Konservierung eines explantierten Organs, dadurch gekennzeichnet, daß er aus einem Behälter für eine Perfusionslösung besteht, in dem das Organ umgeben von der Lösung erhalten werden kann, mit einer Zuleitung und einer Pumpe versehen ist, die zur Zirkulierung einer Perfusionslösung zwischen dem Behälter und den Blutgefäßen des Organs adaptiert worden sind, sowie Mittel zur Aufrechterhaltung der Sauerstoffkonzentration der im Apparat enthaltenen Perfusionslösung besitzt.
- Ein Apparat gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß Zuleitung und Pumpe zur Zirkulierung der Perfusionslösung sich außerhalb des Behälters befinden.

13. Ein Apparat gemäß einem der Ansprüche 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß er Mittel zur Halterung oder Suspendierung eines Organs enthält, wobei die ganze Oberfläche des Organs Kontakt mit der Perfusionslösung hat. 5
14. Ein Apparat gemäß mindestens einem der Ansprüche 11 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß er mit einer Vorrichtung versehen ist, mit deren Hilfe die Temperatur der Perfusionslösung und somit des perfundierten Organs reguliert werden kann. 10
15. Eine Methode zum Testen der Vitalität einer explantierten Leber, welche in einer wäßrigen elektrolythaltigen Lösung perfundiert wird, dadurch gekennzeichnet, daß der Perfusionslösung mindestens eine Aminosäure zugesetzt und nach einem bestimmten Zeitabstand die Konzentration des Ammoniaks bzw. des Harnstoffs in der Perfusionslösung bestimmt wird. 15
16. Eine Methode gemäß Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß eine Mischung von Aminosäuren zugesetzt wird. 20
17. Eine Methode gemäß Anspruch 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, daß 10 bis 100 ml, vorzugsweise 40 bis 60 ml, einer 10 bis 20%igen Aminosäurelösung verwendet werden. 25
18. Eine Methode zum Testen der Vitalität einer explantierten Leber, welche in einer wäßrigen elektrolythaltigen Lösung perfundiert wird, dadurch gekennzeichnet, daß der Lösung eine Fettemulsion zugesetzt und nach einem bestimmten Zeitabstand die Konzentration der freien Fettsäuren bestimmt wird. 30

---

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

---

35

40

45

50

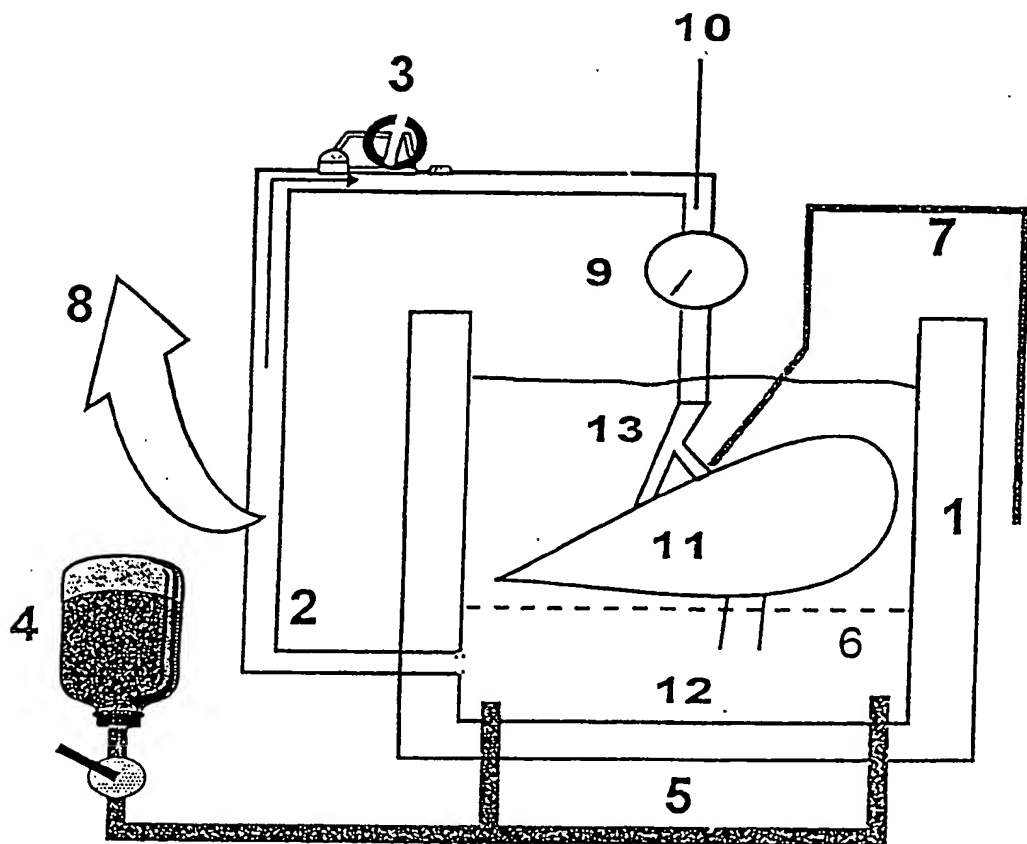
55

60

65

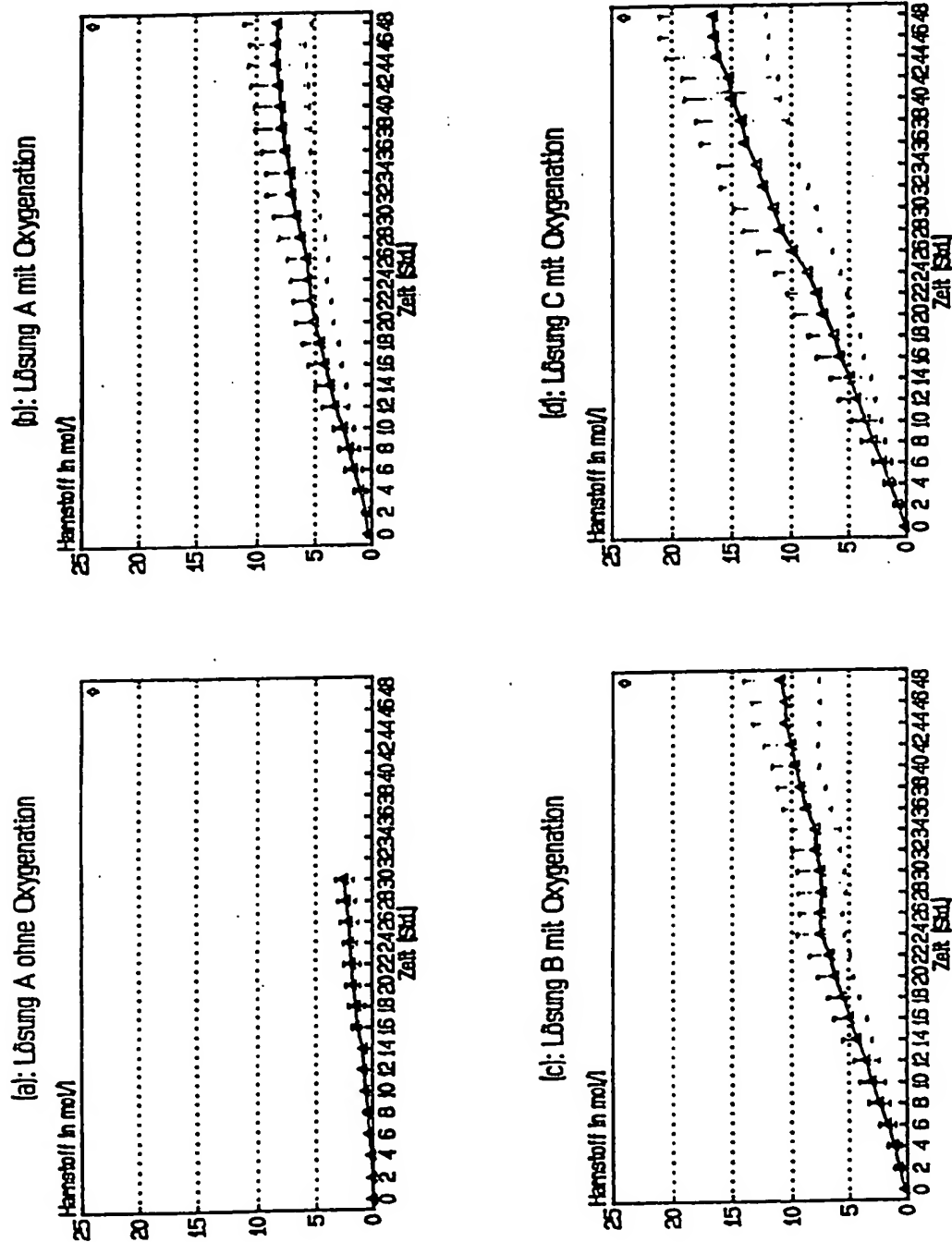
- Leerselte -

Figur 1



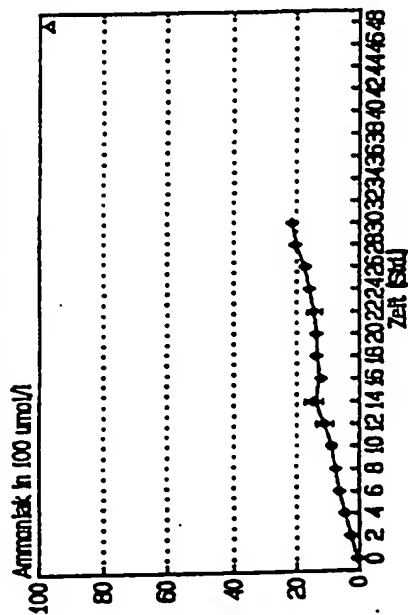


Figur 2: Harnstoff-Konzentration

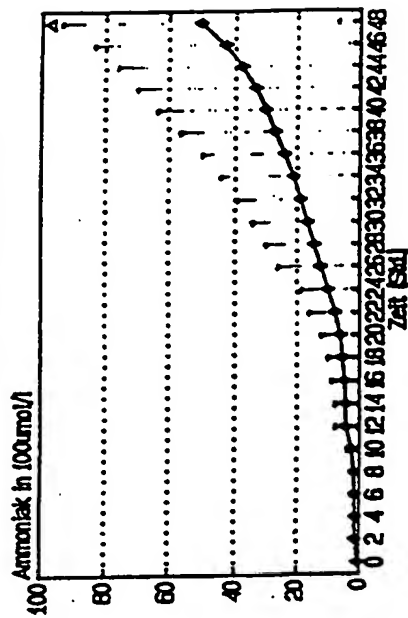


Figur 3: Ammoniak-Konzentration

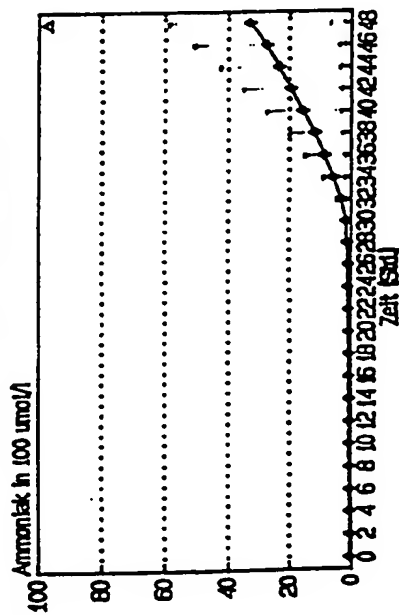
la): Lösung A ohne Oxygenation



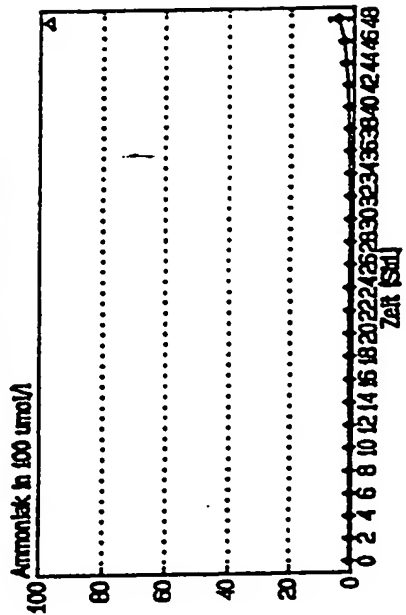
lb): Lösung A mit Oxygenation



lc): Lösung B mit Oxygenation



ld): Lösung C mit Oxygenation



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**